

Microgreffage de méristèmes primaires caulinaires de Pins maritimes (*Pinus pinaster* Ait.) âgés sur de jeunes semis cultivés *in vitro*

Élisabeth DUMAS, André FRANCLÉ et Olivier MONTEUUIS

Résumé — La technique de microgreffage présentée permet de greffer des points végétatifs de *Pinus pinaster* âgés sur de jeunes semis *in vitro* avec un taux de réussite moyen de 68 %. Les méristèmes greffés évoluent plus ou moins rapidement en pousses feuillées, certaines présentant une morphologie juvénile caractérisée qui persiste après acclimatation.

Apical meristem micrografting of mature maritime pines (*Pinus pinaster* Ait.) onto *in vitro* young seedlings

Abstract — The micrografting technique described makes it possible to graft apical meristems belonging to mature *Pinus pinaster* onto *in vitro* young seedlings with an average rate of success of 68%. The grafted meristems produce more or less rapidly leafy shoots some of which exhibit characterized juvenile morphological traits maintained after acclimatization.

Abridged English Version — *In vitro* culture of apical meristems excised from mature selected trees for true-to-type cloning purposes must be objectively considered as a very promising technique ([1], [2]). The possibility of removing the meristems from the inhibiting influence of the maturation process affecting the mother plant would enhance their organogenic response in well adapted culture conditions ([3], [4]). At the same time, contamination risks, known to be very damaging in certain conditions, would diminish.

Referring to the studies on micropropagation of *Pinus pinaster*, the above two aspects seem of primordial interest ([5], [6], [7]). Nevertheless, difficulties encountered in excised meristem cultures on synthetic gelled media, especially for mature material [8], incited us to experiment meristem micrografting techniques ([9], [10], [11]) and to take advantage conjointly of the beneficial effect of the rootstock susceptible to induce rejuvenation ([12] to [17]). Given the satisfactory results, it is of interest to describe the micrografting method applied to *Pinus pinaster*.

The seedlings used as rootstocks were obtained from germinated seeds, transferred after sterilization onto a cellulose acetate "Sorbarod" container saturated with sterile demineralized water. When the epicotyl reached a height about 1 cm, the seedlings could be grafted.

Terminal parts of auxiblasts with quiescent scaly buds were removed from 11, 80 and 100-year-old maritime pine genotypes. These buds were surface disinfected then rapidly and carefully dissected to clear the apical meristem and its surrounding foliar primordia which stood for the scion and did not exceed 400 μm in length. At this stage, the rootstock with its linked Sorbarod container was pulled out of the culture tube to be superficially incised on its epicotyl side just above the cotyledons (fig. 1). The scion was then quickly removed and immediately placed onto the slash. The exudation which flowed out of the incised tissues favored the early adherence of the scion. The next step was to transfer the grafted rootstock onto another Sorbarod saturated with 5 ml of the convenient liquid medium composed of Margara's macronutrients [18], Murashige and Skoog's micronutrients [19], 20 g.l⁻¹ sucrose and 20 g.l⁻¹ activated charcoal.

Note présentée par Alexis MOYSE.

This technique was tested on a total of 186 micrografts corresponding to four different aged genotypes with an average success of 68%. Although the experimental design was too restricted to identify any age effect on the survival rates, it appeared that the meristems removed from the youngest material (11-year old) responded earlier to develop a leafy shoot (fig. 2 A, B and C) with higher frequency of rejuvenated forms exhibiting euphylls exclusively (fig. 2 D). In contrast, scions removed from old genotypes were susceptible to remaining quiescent for several weeks before expanding. A great heterogeneity of responses could nevertheless be observed within each genotype (Tab.). Shoot expansion of the leafy scions was stimulated by cutting back the stock above the graft union and removing the lateral shoots arising from the epicotyl. 80 to 100% of the micrografted stocks were successfully acclimatized in the greenhouse taking advantage of the quality of the root system developed in Sorbarod.

This method of meristem micrografting applied to *Pinus pinaster* appeared to be very helpful to promote micropropagation possibilities of mature trees. Such a technique benefited simultaneously from the meristem culture advantages and from grafting onto juvenile stock and proved to be efficient to rejuvenate in certain occasions. From a technical point of view, the beneficial influence of using Sorbarod as physical *in vitro* culture support ought to be emphasized since it facilitated micrografting manipulations with the possibility to graft outside of the tube without damaging the stock root system and later made the acclimatization phase easier. In addition, the exudation secretion from the incised tissues greatly simplified the micrografting procedure by comparison with *Sequoiadendron giganteum* ([10], [11]). In fact, the connection between the scion and the stock occurred in a very natural way without any exogenous growth regulator or other technical artifice proved to be efficient in other cases ([20], [21]).

These different arguments incited us to develop this micrografting technique making it possible to vegetatively propagate maritime pines from excised meristems with much higher success rates than were to be expected when considering the results obtained up to now. Furthermore, this method seemed in principle applicable to other pine species to improve capacities for true-to-type cloning of selected material as expected by a large number of geneticists, silviculturists, and of course tree propagators.

INTRODUCTION. — La culture *in vitro* de méristèmes primaires caulinaires est une technique très prometteuse, notamment en vue du clonage conforme d'arbres sélectionnés âgés ([1], [2]). La possibilité de soustraire les points végétatifs de l'influence inhibitrice liée au vieillissement de la plante mère favoriserait leur réactivation organogène dans des conditions de culture adéquates ([3], [4]). Conjointement, les risques de contamination sont minimisés.

Dans le cadre des travaux sur la micropropagation du pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.), ces deux atouts majeurs prennent toute leur importance eu égard aux problèmes rencontrés ([5], [6], [7]). Néanmoins, les difficultés inhérentes à la culture de méristèmes de cette espèce sur milieux synthétiques, particulièrement dans le cas de matériel âgé [8], nous ont incités à nous orienter vers le microgreffage de points végétatifs ([9], [10], [11]). De plus, cette technique permet simultanément de tirer profit de l'influence bénéfique du porte-greffe, susceptible d'induire un certain rajeunissement du matériel microgreffé ([12] à [17]). Les résultats satisfaisants obtenus sur *Pinus pinaster* nous ont encouragés à décrire la méthodologie de microgreffage de méristèmes mise au point sur cette espèce.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — 1. *Obtention des porte-greffes.* — Les graines de pin maritime, conservées en chambre froide ($+4^{\circ}\text{C}$), sont désinfectées par trempage dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 110 volumes pendant 20 mn, puis abondamment rincées dans trois bains d'eau déminéralisée stérilisée. Les graines sont ensuite ensemencées individuellement en conditions aseptiques dans des tubes de culture droits de 20×250 mm coiffés de façon non hermétique de capuchons en matière plastique translucide. Chaque tube contient une motte cylindrique de 20×30 mm en acétate de cellulose (« Sorbarod ») imbibée de 5 ml d'eau déminéralisée stérilisée. L'ensemble est ensuite disposé en chambre de culture où des tubes fluorescents « Sylvania Grolux » fournissent une intensité lumineuse de $120 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ pendant 16 h; la température est fixée à $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Dans ces conditions d'environnement, les graines germent rapidement. Les porte-greffes sont greffés après deux mois de culture, lorsque l'épicotyle atteint 1 cm de hauteur.

2. *Origine des greffons.* — Les greffons sont prélevés à l'extrémité des auxiblastes, au sein de bourgeons écaillieux appartenant à quatre génotypes âgés de 11, 80 et 100 ans.

3. *Technique de microgreffage.* — Le microgreffage est réalisé en conditions aseptiques sous loupe binoculaire équipée d'une source de lumière froide.

Après 20 mn de désinfection dans une solution aqueuse d'hypochlorite de calcium à 9 % additionnée de quelques gouttes de mouillant « Teepol », les bourgeons écaillieux sont rincés dans trois bains d'eau déminéralisée stérilisée puis rapidement et précautionneusement disséqués afin de dégager le dôme du méristème apical caulinaire entouré de ses primordia. Cet ensemble qui n'excède pas 0,4 mm de hauteur constitue le greffon. A ce stade, le porte-greffe solidaire de son support de culture Sorbarod est sorti du tube de culture, puis entaillé superficiellement sur 2 mm de longueur au niveau de l'axe épicotylé,

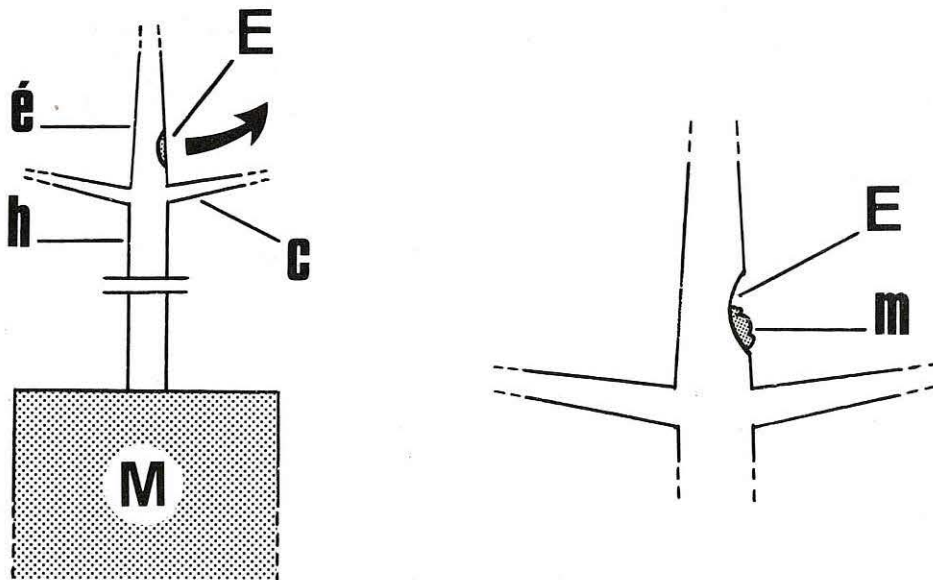


Fig. 1. — Illustration schématisée de la technique de microgreffage décrite : (c) cotylédons du semis porte-greffe; (é) épicotyle; (h) hypocotyle; (m) méristème greffé; (E) entaille superficielle latérale; (M) motte de culture (« Sorbarod »).

Fig. 1. — Schematic illustration of the described micrografting technique: (c) cotyledons of the seedling used as rootstock; (e) epicotyl; (h) hypocotyl; (m) meristem grafted; (E) superficial lateral slash; (M) in vitro culture container (« Sorbarod »).

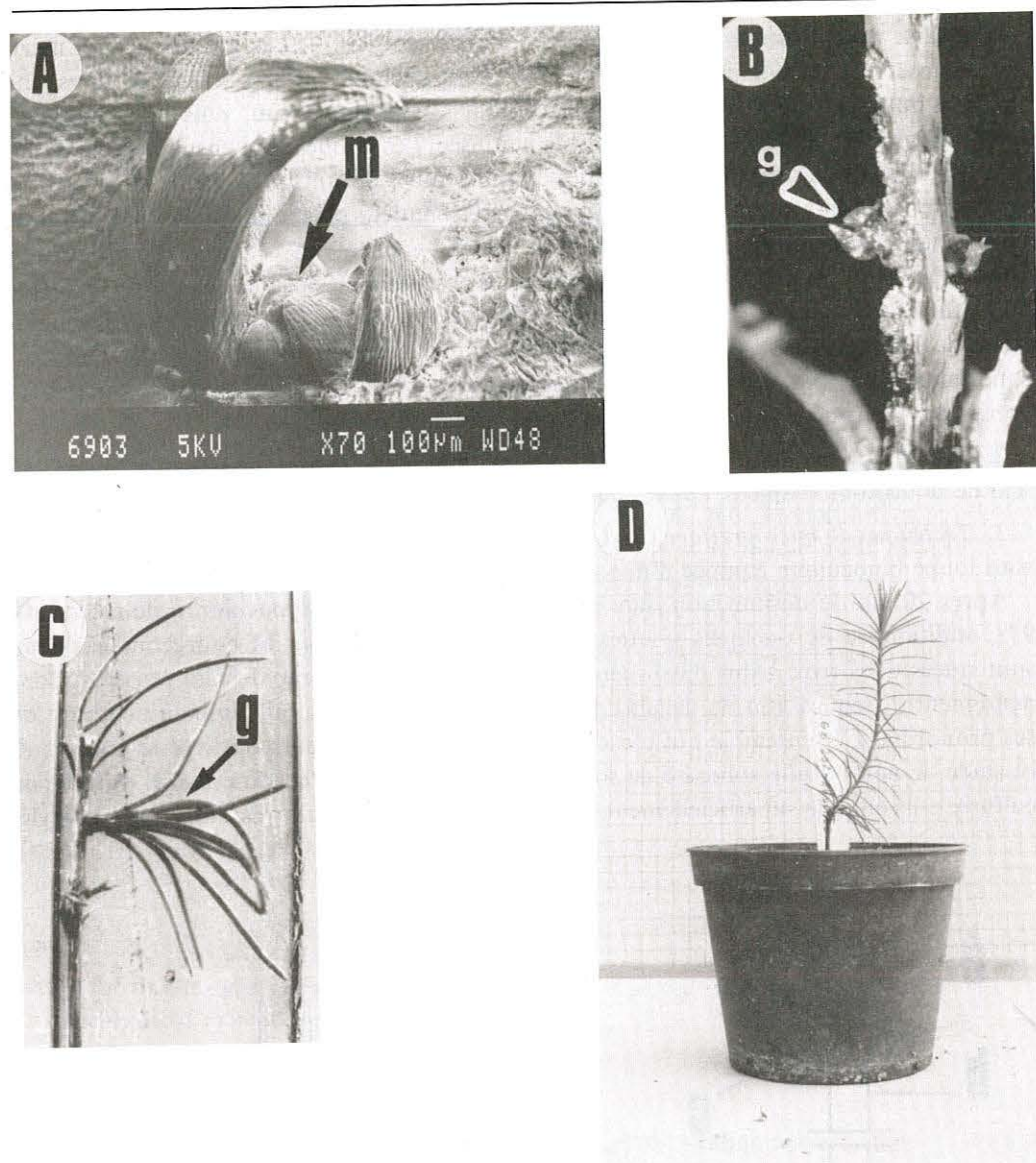


Fig. 2. — Étapes chronologiques du développement du greffon. A, premières phases d'organogenèse du méristème greffé (m); B et C, croissance du greffon (g) sur le côté de l'épicotyle du porte-greffe; D, microgreffe acclimatée présentant des euphylls caractéristiques de l'état juvénile.

Fig. 2. — Chronological stages of the scion development. A, first stages of organogenesis of the grafted meristem (m); B and C, growth of the scion (g) on the side of the rootstock epicotyl; D, acclimatized micrograft exhibiting euphylls which characterize the juvenile state.

à proximité des cotylédons (fig. 1). Le greffon est alors rapidement prélevé, par sectionnement basal au moyen d'un éclat de lame de rasoir pour être immédiatement et délicatement déposé sur l'entaille du porte-greffe. L'exsudat qui s'écoule des tissus incisés favorise l'adhérence précoce du greffon. Le microgreffage proprement dit étant terminé, les porte-greffes sont transférés sur un nouveau Sorbarod imbibé de 5 ml du milieu de culture composé des macro-éléments de Margara [18], des micro-éléments de Murashige et Skoog [19], de 20 g.l^{-1} de saccharose et de 20 g.l^{-1} de charbon actif (Merck 2186).

TABLEAU

Inventaire des microgreffes vivantes 2 mois après le microgreffage *in vitro*
pour chacun des 4 géotypes étudiés.

*Scion survival rates 2 months after the in vitro micrografting
for each of the 4 genotypes tested*

N° d'identification et âge du géotype greffé	Effectifs de microgreffes réalisées	Proportions de greffons vivants après 2 mois
n° 297 - 11 ans	72	47/72 soit 65 %
n° 3110- 80 ans	31	25/31 soit 80 %
n° 4301- 80 ans	21	12/21 soit 57 %
n° 107 -100 ans	62	43/62 soit 69 %

L'ensemble a été préalablement autoclavé 20 mn à 120°C. Les cultures sont ensuite replacées en conditions d'environnement initiales.

RÉSULTATS. — La technique de microgreffage a été appliquée à quatre géotypes d'âges différents. Les effectifs respectifs sont indiqués à titre indicatif dans le tableau. L'inventaire effectué 2 mois plus tard dénombre globalement 127 greffons vivants organogènes sur 186 microgreffes, soit 68 % de réussite.

Dans les situations favorables, l'union s'effectue précocement par prolifération des tissus corticaux entaillés du porte-greffe, prélude à la reprise d'activité organogène du méristème greffé sous forme d'une phyllogenèse active (*fig. 2 A, B et C*). Bien que les effectifs expérimentaux observés ne permettent pas de conclure quant à l'influence de l'âge sur la reprise du greffon, il semble que les méristèmes greffés provenant des géotypes les plus âgés évoluent préférentiellement vers la production de bourgeons écailleux. Ceux-ci, éventuellement entourés d'un ou deux brachyblastes, sont susceptibles de demeurer en repos végétatif apparent plusieurs semaines, voire plusieurs mois. Les greffons prélevés sur du matériel de 11 ans réagissent plus rapidement, parfois au bout de 1 à 2 semaines, en développant une pousse feuillée garnie d'euphylls à morphologie juvénile (*fig. 2 D*). Au vu de nos premières observations, le greffon exprimerait des caractéristiques d'autant plus juvéniles que sa reprise à l'issue du microgreffage est précoce. Néanmoins, une très grande hétérogénéité de réponses subsiste au sein d'un même géotype.

La croissance du greffon est favorisée par un sevrage progressif afin d'éviter une trop forte concurrence avec l'appareil caulinaire du porte-greffe. Les pourcentages de reprise lors de l'acclimatation en serre varient entre 80 et 100 % en fonction de la saison et grâce à la qualité de l'appareil racinaire du porte-greffe développé *in vitro* en Sorbarod.

DISCUSSION ET CONCLUSION. — En 1986, nous proposons une nouvelle technique de microgreffage permettant de propager végétativement avec 35 % de succès des *Sequoiadendron giganteum* centenaires à partir de points végétatifs [10]. Les résultats exposés montrent que cette méthode est applicable au Pin maritime, en l'adaptant aux particularités spécifiques et en l'améliorant par la même occasion.

Ainsi, le support de culture Sorbarod, destiné à faciliter les manipulations de microgreffage sans léser l'appareil racinaire et tout en garantissant sa neutralité chimique vis-à-vis du milieu de culture *in vitro*, présente l'avantage d'être biodégradable en conditions horticoles et facilite de ce fait l'acclimatation.

Par ailleurs, la sécrétion d'exsudat au niveau des tissus entaillés permet de simplifier considérablement les manipulations par rapport à *Sequoiadendron giganteum* ([10], [11]), en gagnant en rapidité d'exécution et en augmentant simultanément les taux de réussite. En fait, l'union entre le porte-greffe et le greffon, réduit au méristème caulinaire apical sans embase, s'effectue précocement de façon très naturelle en l'absence de toute substance de croissance exogène, antioxydant et autres artifices avantageusement employés dans d'autres cas ([9], [20], [21]).

Ces divers arguments nous incitent à développer cette technique convoitée [20] qui permet de cloner des Pins maritimes sélectionnés âgés à partir de méristèmes dans des proportions bien supérieures aux résultats obtenus sur milieux de culture artificiels [8]. De plus, cette méthode paraît transposable dans son principe aux autres espèces du genre. Certains aspects méritent néanmoins d'être analysés de façon plus approfondie, tels que l'influence de l'âge du pied-mère originel sur le devenir des méristèmes greffés et leur aptitude à recouvrer certains caractères juvéniles. Par ailleurs, l'hétérogénéité de réponses constatée à l'intérieur d'un même génotype devrait pouvoir être minimisée en accordant plus d'attention au stade physiologique du méristème au moment du prélèvement au sein du bourgeon écaillé [21]. Ces principaux thèmes d'investigation sont actuellement étudiés dans notre laboratoire.

Note remise le 18 septembre 1989, acceptée après révision le 9 novembre 1989.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] J. MARGARA, *Bases de la multiplication végétative*, I.N.R.A., Versailles, 1982, 262 p.
- [2] A. FRANCLÉ, M. BOULAY, F. BEKKAOUI, Y. FOURET, B. VERSCHOORE-MARTOUZET et N. WALKER dans *Cell and Tissue Culture in Forestry*, J. M. BONGA et D. J. DURZAN éd., Canadian Forestry Service/University of California, 1987, 1, p. 232-248.
- [3] N. WALKER, *Annales AFOCEL* 1985, 1986, p. 25-47.
- [4] O. MONTEUUIS, *Thèse de doctorat*, Clermont-Ferrand, 1988, 190 p.
- [5] K. ISEMUKALI, *Thèse de doctorat*, Bordeaux, 1979, 169 p.
- [6] A. DAVID, H. DAVID, M. FAYE et K. ISEMUKALI, *AFOCEL Études et Recherches*, 12, 1979, p. 33-40.
- [7] E. DUMAS, *Annales AFOCEL* 1986, 1987, p. 95-107.
- [8] N. WALKER, E. DUMAS, A. FRANCLÉ et F. BEKKAOUI, *Annales AFOCEL* 1984, 1985, p. 87-109.
- [9] R. JONARD, dans *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1986, 1, Trees, p. 31-48.
- [10] O. MONTEUUIS, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 302, série III, 1986, p. 223-225.
- [11] O. MONTEUUIS, *Annales AFOCEL* 1986, 1987, p. 39-61.
- [12] J. DOORENBOS, *Preb.*, 115, Wageningen, 1953, p. 98-102.
- [13] T. DE LA GOUBLAYE DE NANTOIS, *D.E.A.*, Paris-VI, 1980, 44 p.
- [14] A. FRANCLÉ, *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 130, (2), 1983, p. 87-98.
- [15] J. P. MISSON et P. GIOT-WIRGOT, *Annales AFOCEL* 1984, 1985, p. 187-197.
- [16] F. PLIEGO-ALFARO et T. MURASHIGE, *HortScience*, 22, 1987, p. 1321-1324.
- [17] L. NAVARRO, *Acta Horticulturae*, 227, 1988, p. 43-56.
- [18] J. MARGARA, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 285, série D, 1977, p. 1041-1044.
- [19] T. MURASHIGE et F. SKOOG, *Physiol. Plant*, 15, 1963, p. 473-497.
- [20] H. TRANVAN et A. DAVID, *Can. J. Bot.*, 63, 1985, p. 1017-1020.
- [21] R. JONARD, I. SOEDMARMA et P. VILLEMUR, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 305, série III, 1987, p. 45-49.

Association Forêt Cellulose (AFOCEL), Domaine de l'Étançon, 77370 Nangis.